Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (3) : 227-234

CONTRÔLE DE LA FORMATION DES RHIZOMORPHES D'*ARMILLARIELLA MELLEA* (VAHL. ex FR.) KARST. PAR L'ALTERNATIVE NITRATE-AMMONIUM ET CERTAINS ACIDES AMINÉS

par B. Ch. BEHBOUDI*, H. EBRAHIMZADEH et G. HADADTCHI

RÉSUMÉ. — Étude du pouvoir inducteur du milieu de culture sur la différenciation des hyphes non agrégées en pseudosclérotes et en rhizomorphes chez *Armillariella mellea*. L'emploi d'un milieu nutritif spécifique permet de contrôler la genèse des rhizomorphes à partir des hyphes non agrégées. Les nitrates induisent la formation des rhizomorphes, l'ammonium inhibe leur initiation. La croissance des rhizomorphes est stimulée par la présence de peptone, de sérine et d'alanine.

ABSTRACT. — The induction's power of the culture medium on differentiation of non aggregated hyphae to pseudosclerotia and rhizomorphs has been investigated in *Armillariella mellea*. The use of a specific nutrition medium has permited to control the initiation of rhizomorphs from non aggregated hyphae. Nitrates induced the rhizomorphs formation, whereas ammonium salts inhibited their initiation. The growth of rhizomorphs increased in presence of peptone, serine or alanine.

MOTS CLÉS : *Armillariella mellea*, rhizomorphes, nutrition azotée minérale, peptone, alanine, sérine.

Diverses études ont déjà été réalisées sur le comportement *in vitro* d'isolats d'*Armillariella mellea* s. l. originaires de zones géographiques distinctes, ainsi que sur l'effet de quelques composants du milieu sur l'initiation rhizomorphique (JACQUES-FÉLIX, 1968; BEHBOUDI, 1974, 1977b). On sait par exemple que l'éthanol stimule la croissance des hyphes et des rhizomorphes en culture, mais n'affecte guère ni la consommation, ni l'utilisation du glucose. A l'aide de glucose marqué au C^{14}, il a pu être montré que la radioactivité, en présence d'éthanol, s'exprime dans le glucose intracellulaire et les polysaccharides pariétaux, alors que le CO_2, les lipides et les métabolites du cycle de Krebs restent peu radioactifs (GARRAWAY & WEINHOLD, 1968). L'acétate exerce un effet

* Dr. B. Ch. BEHBOUDI, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

similaire à celui de l'éthanol sur la croissance des hyphes et l'initiation des rhizomorphes et, enfin, en présence de l'un ou l'autre de ces composés, le disulfiram inhibe la formation des rhizomorphes et la croissance des hyphes (SORTKJAER & ALLERMANN, 1972). Ces recherches établissent donc l'importance du rôle de l'éthanol, de l'acétaldéhyde et de l'acétate au niveau de la différenciation des rhizomorphes.

L'effet de quelques composés aromatiques et de leurs précurseurs sur la formation des rhizomorphes a également fait l'objet d'études. Il en résulte que l'acide para-aminobenzoïque (APAB) et l'acide ortho-aminobenzoïque (AOAB) stimulent l'initiation et la croissance des rhizomorphes, alors que l'acide méta-aminobenzoïque (AMAB) n'a pas d'effet (GARRAWAY, 1970). L'adjonction au milieu d'autres composés aromatiques tels que l'aldéhyde protocatéchique, l'acide quinique, l'acide shikimique, le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine accroît seulement la croissance des hyphes, sans induire l'initiation rhizomorphique (GARRAWAY, 1970). Chez *Neurospora crassa*, l'AOAB peut participer à la synthèse de composés indoliques tels que l'acide indol-acétique (AIA) et pourrait fonctionner comme inducteur ou dérépresseur de l'activité tryptophane-synthéthase dans la biosynthèse des composés indoliques (MATCHETT & ROSS, 1963; TURNE & MATCHETT, 1968). Pour ces raisons, certains auteurs ont suggéré que l'AIA pourrait stimuler la formation et la croissance des rhizomorphes et que l'AOAB agirait alors sur la croissance des rhizomorphes en affectant le métabolisme de l'AIA (GARRAWAY, 1969, 1970).

Le présent travail tente de mettre au point un milieu dont la composition permettrait de contrôler aisément la différenciation rhizomorphique en jouant sur quelques constituants. Dans un second temps, nous comparerons les effets de quelques acides aminés sur la formation des rhizomorphes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des basidiocarpes qui se sont révélés appartenir à une nouvelle race d'*Armillariella mellea* (BEHBOUDI, 1977a) ont été récoltés dans la forêt de Kare Sang, au nord de l'Iran, en novembre 1975. A partir du chapeau d'un basidiocarpe, des cultures ont été établies sur un milieu standard malt-agar à 45 g/l comprenant : 12,75 g de maltose, 2,75 g de dextrine, 2,35 g de glycérol et 0,75 g de peptone par litre. La température d'incubation est de 25°C. Des sous-cultures sont établies à partir d'explantats de 3 mm de diamètre prélevés en boîtes de Pétri.

La différenciation rhizomorphique apparaît dans les cultures issues de fragments de basidiocarpes sur milieu malt-agar, toutes les parties de l'explantat étant aptes à produire des hyphes aussi bien que des pseudosclérotes ou des rhizomorphes : les hyphes apparaissent 4 jours, et les rhizomorphes 6 jours, après l'inoculation (Fig. 1). Sur le milieu standard, la séquence d'apparition des hyphes, des pseudosclérotes et des rhizomorphes est trop intriquée et trop rapide, difficilement appréhendable.

Pour cette raison, un nouveau milieu a été élaboré pour essayer de dissocier l'expression des stades successifs de la formation des rhizomorphes et de la différenciation. Ce milieu contient les macroéléments de la solution de Knop et les oligoéléments de la solution de Heller. Toutefois, le chlorure de fer a été éliminé, en lui substituant 5 ml/l d'une solution contenant 7,35 g de Na_2EDTA et 5,57 g de $FeSO_4.7H_2O$ par litre. De l'oxyde de molybdène (1 ml/l d'une solution contenant 10^{-4} mg/l) est encore ajouté, ainsi que 13 g d'agar, 20 g de glucose, 1 mg de vitamine B_1 et 0,5 mg de vitamines B_2, B_6, C et PP par litre de milieu. Ce milieu de culture contenant l'azote sous la forme de nitrates est dénommé «milieu solide MN».

A partir de ce milieu, l'élimination des nitrates de potassium et de calcium et leur remplacement par 0,57 g/l de chlorure d'ammonium, 0,62 g/l de chlorure de calcium et 0,18 g/l de chlorure de potassium procurent un milieu contenant l'azote sous la forme ammonium, dénommé «milieu solide MA».

RÉSULTATS

Après le repiquage sur le milieu solide MN, on observe une apparition graduelle d'hyphes diffuses, blanches; plus tard, se mettent en place autour de l'inoculum des zones hyphales concentriques (Fig. 2) sur lesquelles on peut voir, en quelques points et après 45 à 60 jours, la formation de pseudosclérotes à partir desquels vont émerger de fins rhizomorphes. Sur le milieu solide MA, seuls se forment les cercles concentriques d'hyphes non agrégées, sans aucune formation de pseudosclérotes ni de rhizomorphes (Fig. 3). L'addition d'AIA (10^{-7}M) n'a aucun effet sur la formation des rhizomorphes et fait disparaître la zonation circulaire du mycélium, ce qui semble infirmer l'hypothèse selon laquelle l'AIA pourrait stimuler la formation et la croissance des rhizomorphes (GARRAWAY, 1969, 1970).

L'intérêt de ces deux milieux est leur aptitude à échelonner dans le temps ou à dissocier les différentes étapes de la croissance mycélienne et de la différenciation des pseudosclérotes et rhizomorphes. Leurs inconvénients majeurs sont la difficulté de récolte séparée des hyphes et des rhizomorphes et la lenteur du développement; il a pu y être remédié en utilisant simultanément la culture en milieu liquide et l'adjonction de peptone.

Pour réaliser les cultures en milieu liquide, le champignon est inoculé en tubes contenant 20 ml des milieux précédents dont on a supprimé l'agar. Certains des inoculums sombrent au fond de la solution alors que d'autres demeurent en surface. Les réponses aux milieux liquides sont globalement les mêmes que dans le cas des milieux solides. En milieu liquide MN, on observe après 45 à 60 jours la formation de couches blanches de pseudosclérotes et de rhizomorphes (Fig. 4, 6a), et ceci aussi bien dans le cas des thalles immergés que dans celui des thalles surnageants. Par contre, en milieu MA, les hyphes poursuivent leur croissance sans aucune agrégation (Fig. 6b, Tableau I).


BIBLIO
MUSEUM
PARIS

Tableau I — Variation de la croissance globale en milieux liquides MN et MA.
Table I — Variation of growth (dry weight) in the MN and MA liquid media.

Age des cultures (jours)	Poids sec des cultures (mg)	
	milieu liquide MN	milieu liquide MA
10	2	4
28	3	12
40	4	19
50	4*	24
63	5*	28

* dans le milieu liquide MN, après 50 jours, les hyphes sont différenciés [redacted] rhizomorphes. Dans ce cas, à [redacted] et 63 jours, le poids sec correspond à l'ensemble hyphes + rhizomorphes.

L'addition de peptone (5 g/l) augmente le poids sec et induit ou amplifie, sur les deux milieux liquides mais alors seulement chez les thalles surnageants, la formation des rhizomorphes qui apparaissent après 3 à 7 jours sur le milieu MN, après 7 à 10 jours sur le milieu MA. La variante essentielle entre les réactions à ces deux milieux est une stimulation relativement un peu plus importante de la production hyphale sur le milieu MA, de la production rhizomorphique sur le milieu MN (Tableau II).

Les mêmes résultats s'observant après adjonction de peptone aux milieux MN et MA solides, il apparaît que la peptone est bien un facteur améliorant la croissance des hyphes et des rhizomorphes. Nous avons alors tenté de substituer des acides aminés à la peptone.

Figure 1 — Développement des hyphes (H), pseudosclérotes (P) et rhizomorphes sur milieu malt-agar. Figure 2 — Formation de pseudosclérotes (P) et différenciation des rhizomorphes (R) sur milieu solide MN après 60 jours. Figure 3 — Formation de cercles concentriques d'hyphes non agrégées sur le milieu solide MA après 60 jours. Figure 4 — Initiation des rhizomorphes dans le milieu liquide MN après 60 jours. Figure 5 — Rhizomorphes (R) formés à 20-30 jours, en présence de sérine, dans le milieu liquide MN. Figure 6 — a, différenciation des rhizomorphes dans le milieu MN liquide; b, dans le milieu liquide MA, la différenciation des rhizomorphes ne se réalise pas.

Figure 1 — Growth of hyphae (H), pseudosclerotia (P) and rhizomorphs (R) in malt-agar medium. Figure 2 — Formation of pseudosclerotia (P) and rhizomorph differentiation (R) in MN solid medium after 60 days. Figure 3 — Formation of concentric circles of non-aggregated hyphae in the MA solid medium after 60 days. Figure 4 — Rhizomorphs initiation in the MN liquid medium after 60 days. Figure 5 — In the presence of serine, rhizomorphs (R) formed at 20-30 days in the MN liquid medium. Figure 6 — a, rhizomorph differentiation in MN liquid medium; b, in MA liquid medium, the differentiation of rhizomorphs does not take place.

Tableau II — Variation de la croissance des hyphes (au fond du milieu) et des rhizomorphes (à la surface du milieu) chez les milieux liquides MN et MA contenant de la peptone.

Table II — Variation of growth of hyphae (at bottom of medium) and rhizomorphs (at the liquid surface) in the MN and MA media plus peptone.

Age des cultures (jours)	Milieu liquide MN + peptone		Milieu liquide MA + peptone	
	poids sec des hyphes (mg)	poids sec des rhizomorphes (mg)	poids sec des hyphes (mg)	poids sec des rhizomorphes (mg)
16	20	80	35	60
20	25	125	60	74
34	60	215	75	175
50	70	300	80	240

Tableau III — Effets de divers acides aminés sur la différenciation des rhizomorphes sur milieux MN et MA liquides.

Table III — Effects of amino-acids on differentiation of rhizomorphs in MN and MA liquid media.

Acides aminés	Milieu liquide [illegible]			Milieu liquide MA		
	poids sec (mg)	rhizomorphes	hyphes	poids sec (mg)	rhizomorphes	hyphes
-	2	+*	+*	29	-*	+*
Alanine	260	+++	++	220	+++	++
Cystéine	25	-	++	35	-	++
Cystine	25	-	++	30	-	++
Glycine	27	-	++	27	-	++
Histidine	20	-	++	28	-	++
Leucine	28	-	++	20	-	++
Lysine	30	-	++	33	-	++
Méthionine	27	-	++	26	-	++
Phényl-alanine	30	-	++	34	-	++
Proline	30	-	++	35	-	++
Sérine	270	+++	++	230	+++	++
Tryptophane	30	-	++	30	-	++
Tyrosine	20	-	++	19	-	++
Valine	23	-	++	15	-	++
DL-valine	15	++	++	20	-	++

* les signes + indiquent la présence et l'intensité de la croissance des rhizomorphes et des hyphes; les signes - indiquent l'absence de rhizomorphes.

L'addition d'acides aminés variés (5 g/l) aux milieux MN et MA liquides conduit à des réactions différentielles sur la production de poids sec et de rhizomorphes (Tableau III), certains acides aminés seulement exprimant un effet similaire à celui de la peptone : alanine et sérine en présence desquelles les rhizomorphes apparaissent à 20-30 jours sur milieu MN (Fig. 5), 30-45 jours sur milieu MA. La DL-valine stimule également la formation de rhizomorphes, mais seulement sur milieu MN où ils sont alors fins et foncés. Sur milieu MN, la tyrosine permet la différenciation des pseudosclérotes, mais non suivie de l'émission des rhizomorphes et, si le tryptophane n'engendre ni pseudosclérotes ni rhizomorphes, il induit une excrétion de pigment foncé dans le milieu.

CONCLUSIONS

L'ensemble de nos expérimentations montre que les rhizomorphes naissent toujours à partir de pseudosclérotes et que le milieu MN autorise la formation des rhizomorphes à la fois chez les cultures surnageantes et immergées, alors que le milieu MA ne permet aucune agrégation. L'adjonction de peptone, de sérine ou d'alanine induit ou/et stimule la formation des rhizomorphes sur les milieux MN et MA, mais la différenciation rhizomorphique qui, dans les deux cas, reste localisée aux seules cultures surnageantes, est plus rapide en présence de nitrates qu'en présence d'ammonium.

On associe souvent la différenciation, chez les champignons, à des modifications des processus de respiration et de fermentation : certains de nos résultats suggèrent qu'il puisse en être de même à propos de la production rhizomorphique. C'est en premier lieu le cas de l'effet stimulant de la peptone, pouvant impliquer l'intervention de certains de ses acides aminés à l'action similaire, en particulier la sérine et l'alanine, comestibles en acide pyruvique (BLOOM & FALL, 1974; DANCER & MANDELSTAM, 1974). C'est également celui de l'action différentielle des milieux liquides MN et MA où les nitrates autorisent la rhizomorphogenèse, tant superficielle qu'immergée alors que l'ammonium, favorisant la glycolyse au dépens des réactions oxydatives (SOLS, 1968), ne permet qu'une production d'hyphes diffuses : les ions nitrate et ammonium pourraient contrôler la formation des rhizomorphes comme ils semblent contrôler la morphogenèse en intensifiant ou en réduisant l'effet Pasteur comme il ressort des travaux réalisés sur la différenciation conidienne de *Neurospora* (TURIAN, 1964) et la différenciation ascosporale des levures (MILLER, 1959).

BIBLIOGRAPHIE

BEHBOUDI B.Ch., 1974 — Contribution à l'étude morphologique, morphogénétique et cytologique de l'*Armillaria mellea*. Thèse de docteur-ingénieur, Faculté des Sciences de Paris, 88 p., 31 pl.

BEHBOUDI B. Ch., 1977a — A comparison between morphogenesis of north iranian and

french *Armillaria mellea.* 6th Plant Medecine Congress of Iran (Abstracts), p. 37.

BEHBOUDI B.Ch., 1977 b — Morphogenèse de l'*Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quélet à anneau membraneux blanc in vitro. *Bull. Fac. Sci. Tehran Univ.* 9 (n° 1) : 1-9.

BLOOM F.R. and FALL E.M., 1974 — Isolation and characterization of D-serine deami-[redacted] constitutive mutants by utilization of D-serine as sole carbon or nitrogen source. *J. Bacteriol.* 121 : 1078-1084.

DANCER B.N. and MANDELSTAM J., 1974 — Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis. J. Bacteriol.* 121 : 406-410.

GARRAWAY M.O. and WEINHOLD A.R., 1968 — Influence of ethanol on the distribution of glucose-C^{14} assimilated by *Armillaria mellea. Phytopathology* 58 : 1652-1657.

GARRAWAY M.O., 1969 — Influence of compounds related to the shikimic acid pathway on rhizomorph initiation and growth in *Armillaria mellea. Phytopathology* 59 : 102.

GARRAWAY M.O., 1970 — Rhizomorph initiation and growth in *Armillaria mellea* promoted by o-aminobenzoic acid and p-aminobenzoic acid. *Phytopathology* 60 : 861-865.

JACQUES-FÉLIX M., 1968 — Recherches morphologiques, anatomiques, morphogénétiques et physiologiques sur des rhizomorphes de champignons supérieurs et sur le déterminisme de leur formation. *Bull. Soc. Mycol. France* 84 : 161-307.

MATCHETT W.H. and ROSS J.A., 1963 — Direct evidence for a tryptophan anthranilic acid cycle in *Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Acta* 71 : 632-642.

MILLER J.J., 1959 — A comparison of the sporulation physiology of yeast and aerobic bacilli. *Wallerstein Lab. Commun.* 22 : 267-283.

SOLS A., 1968 — Regulation of carbohydrate transport and metabolism in yeast. *In* : MILLS A.K. & KREBS H., *Aspect of yeast metabolism*, Guiéess Symp. Oxford and Edinburg : Blackwell Sci. Public. : 47-66.

SORTKJAER O. and ALLERMANN K., 1972 — Rhizomorph formation in fungi. I. Stimulation by ethanol and acetate and inhibition by disulfiram of growth and rhizomorph formation in *Armillaria mellea. Physiol. Pl.* 26 : 376-380.

TURIAN G., 1964 — Synthetic conidiogenous media for *Neurospora crassa. Nature (London)* 202 : 1240.

TURNE R.J. and MATCHETT W.H., 1968 — Alteration tryptophan mediated regulation in *Neurospora crassa* indolglycerol phosphate. *J. Bacteriol.* 95 : 1608-1614.

WESTERGARD M. and MITCHELL H.K., 1947 — *Neurospora.* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* 34 : 573-577.